



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12N 15/16, C07K 14/575, A61K 38/22, C12Q 1/68		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/31265 (43) Date de publication internationale: 2 juin 2000 (02.06.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02941 (22) Date de dépôt international: 26 novembre 1999 (26.11.99)		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Données relatives à la priorité: 98/14914 26 novembre 1998 (26.11.98) FR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101 rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): BEAUVILLAIN, Jean-Claude [FR/FR]; 47 bis rue Wattrelot, F-59175 Temple Mars (FR). COULOUARN, Yolaine [FR/FR]; 24 allée Arromanches, Appt B106, F-76000 Rouen (FR). JEGOU, Sylvie [FR/FR]; 4 impasse Tabouret, F-76000 Rouen (FR). LIHRMANN, Isabelle [FR/FR]; 19 rue de la Haizette, F-27310 Saint Ouen de Thouberville (FR). VAUDRY, Hubert [FR/FR]; 36 route d'Epouville, F-76133 Manneglise (FR).			
(74) Mandataires: ORES, Béatrice etc.; Cabinet Orès, 6 Avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).			

(54) Title: UROTENSINS II OF MAMMALS AND THEIR USES

(54) Titre: UROTENSINES II DE MAMMIFERES ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract

The invention concerns peptides of mammals having a urotensin II (UII) structure, and their uses as medicines, in particular in the form of a composition for treating neurodegenerative diseases or traumatism of the spinal cord. Said polypeptides comprise at their C-terminal end a heptapeptide with the following sequence: Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Xaa wherein Xaa represents Val or Ile characterised in that they belong to the family of urotensin II and they have at least 45 %, and preferably at least 70 % similarity with the polypeptide of sequence SEQ ID NO:1, corresponding to the human prepro-urotensin II. The invention also concerns nucleic acid sequences coding for said polypeptides, oligonucleotides included in said sequences, and the use of said sequences as primers and probes and for expressing urotensin II of mammals. The invention also concerns the use of said polypeptides for selecting hypertension activity antagonists.

(57) Abrégé

Peptides de mammifères présentant une structure de type urotensine II (UII), ainsi que leurs applications en tant que médicament, notamment sous la forme d'une composition destinée au traitement des maladies neurodégénératives ou des traumatismes de la moelle épinière. Lesdits polypeptides comprennent à leur extrémité C-terminale un heptapeptide présentant la séquence suivante: Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Xaa dans laquelle Xaa représente Val ou Ile, en ce qu'ils appartiennent à la famille des urotensines II et en ce qu'ils présentent au moins 45 %, et de préférence au moins 70 % de similarité avec le polypeptide de séquence SEQ ID NO:1, correspondant à la prépro-urotensine II humaine. Séquences d'acides nucléiques codant pour lesdits polypeptides, oligonucléotides compris dans lesdites séquences, et utilisation desdites séquences comme amores et comme sondes et pour l'expression des urotensines II de mammifères. Utilisation desdits polypeptides pour la sélection d'anti-hypertenseurs.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lithuanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		

UROTENSINES II DE MAMMIFERES ET LEURS APPLICATIONS

La présente invention est relative à des polypeptides de mammifères, notamment d'origine humaine ou murine, présentant une structure de type urotensine II (UII) (prépro-urotensine II, pro-urotensine II et urotensine II), ainsi qu'à leurs applications en tant que médicament, notamment sous la forme d'une composition destinée au traitement des maladies neurodégénératives ou des traumatismes de la moelle épinière (hémiplégie, paraplégie) et en tant qu'outil de criblage de médicaments anti-hypertenseurs.

La présente invention est également relative à des séquences d'acides nucléiques codant pour lesdits polypeptides, à des oligonucléotides compris dans lesdites séquences, et à l'utilisation desdites séquences comme amorces et comme sondes ou pour l'expression des urotensines II de mammifères et notamment de l'urotensine II humaine ou murine.

L'urotensine II est un neuropeptide qui a d'abord été caractérisé dans l'urophyshe des poissons téléostéens. Chez ces poissons, l'urotensine II est un peptide cyclique comprenant 12 acides aminés. La caractérisation de l'urotensine II chez plusieurs espèces de poissons téléostéens a montré que la structure de l'heptapeptide cyclique C-terminal est conservée, tandis que l'on observe des substitutions dans la partie N-terminale de la molécule. Cet heptapeptide présente la séquence suivante : Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val (SEQ ID NO:9) (1-3).

On a longtemps pensé que ce peptide était produit exclusivement dans l'urophyshe des poissons téléostéens (3), un petit organe neurohémal présentant des similitudes avec la neurohypophyse, localisé à l'extrémité caudale de la moelle épinière ; toutefois, il est apparu que ce neuropeptide n'est pas confiné au système neurosecrétoire caudal du poisson. Il a également été isolé à partir d'extraits de cerveaux de truite, de raie (4) ou de lamproie (5). En outre, un peptide similaire à l'urotensine II de poisson a été détecté dans le système nerveux central (SNC) de la grenouille (*Rana ridibunda*) (6) et chez un gastéropode (*Aplysia californica*), au niveau du ganglion cérébral (7).

Ce peptide, qui comprend chez la grenouille, 13 acides aminés, présente des similarités de structure avec les urotensines II de poisson, et notamment la région cyclique contenant l'heptapeptide précité.

Ce neuropeptide, présente également des similarités avec la somatostatine (2,3) ; toutefois, l'urotensine II de poisson présente essentiellement des effets cardiovasculaires, que l'on peut également observer lorsque cette urotensine est administrée à un mammifère, tel que le rat ou le lapin (8,9) : effet contractile sur les artères

(action observée chez le rat (8) et le lapin (10)), contraction des muscles lisses (effet spasmogène sur certains muscles lisses (vessie et iléum), chez les amphibiens (11)), effets sur le rythme cardiaque (observés chez les amphibiens (12)).

Il a également été montré que l'urotensine II de poisson est exprimée sous la forme de précurseurs, dont les structures primaires ont été déterminées à partir du système neurosécrétoire caudal de la carpe (*Cyprinus carpio*) (13).

Les Inventeurs ont trouvé, de manière inattendue, qu'une urotensine II était exprimée chez les mammifères, notamment chez l'homme et chez les murins et qu'elle pouvait présenter, chez l'homme une activité sur la survie et/ou la régénération des motoneurones et sur la pression artérielle (hypertension).

La présente invention a pour objet des polypeptides, isolés de mammifères, caractérisés en ce qu'ils comprennent à leur extrémité C-terminale un heptapeptide présentant la séquence suivante : Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Xaa dans laquelle Xaa représente Val ou Ile, en ce qu'ils appartiennent à la famille des urotensines II et en ce qu'ils présentent au moins 45 %, et de préférence au moins 70 % de similarité avec le polypeptide de séquence SEQ ID NO:1, correspondant à la prépro-urotensine II humaine.

La similarité est quantifiée à l'aide du logiciel Clustal®, notamment accessible sur l'Internet (site <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>).

La présente invention englobe en particulier :

- la prépro-urotensine II humaine (SEQ ID NO:1), la pro-urotensine II humaine (SEQ ID NO:2) et l'urotensine II humaine (SEQ ID NO:3),

- la prépro-urotensine II de rat (SEQ ID NO:30), la pro-urotensine II de rat (SEQ ID NO:31) et l'urotensine II de rat (SEQ ID NO:32),

- la prépro-urotensine II de souris (SEQ ID NO:33), la pro-urotensine II de souris (SEQ ID NO:34) et l'urotensine II de souris (SEQ ID NO:35).

Ces séquences polypeptidiques de mammifères présentent globalement une faible similarité avec les séquences de poisson ou de grenouille (figure 1 et figure 4) :

- 16 % de similarité entre la prépro-UII- α ou la prépro-UII- γ de carpe et la prépro-UII humaine ;

- 25 % de similarité entre la prépro-UII de grenouille et la prépro-UII humaine.

Au niveau N-terminal de l'UII humaine, ces séquences ne présentent aucune similarité avec les UII de non-mammifères antérieurement décrites.

L'invention englobe également des polypeptides ou des peptides dérivés des urotensines II de mammifère et de leurs précurseurs, selon l'invention, par

addition, délétion ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés ; il peut s'agir par exemple de polypeptides dans lesquels des modifications ont été apportées, notamment par substitution des acides aminés dextrogyres par des acides aminés levogyres (pseudopeptides) ou de polypeptides obtenus par modélisation moléculaire et présentant une activité d'urotensine II au niveau de la jonction neuromusculaire ou des autres cibles biologiques de l'urotensine II.

La présente invention a également pour objet un fragment d'acide nucléique purifié, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence codant pour une urotensine II de mammifère telle que définie ci-dessus ou de sa séquence complémentaire, sens ou anti-sens, à l'exception de l'EST ayant pour 10 numéro d'accession Gen Bank, le n° AA535545.

Dans ce cadre, la présente invention englobe en particulier les ADNc, les ARNm et les ADN génomiques des urotensines II et de leurs précurseurs.

Elle englobe en particulier les séquences suivantes :

15

* séquences humaines :

- la séquence codant pour la prépro-urotensine II humaine, de séquence SEQ ID NO:4, qui comprend 551 pb et dans laquelle :

20

. le segment 1-32 est une séquence non-codante,

. le segment 33-407 code pour la prépro-urotensine II humaine, le

segment 33-92 correspondant à la séquence codant pour le peptide signal et

. le segment 408-551 est non-codant (voir figure 2),

25

- un fragment de la séquence codant pour la prépro-urotensine II

humaine (séquence SEQ ID NO:5), caractérisé en ce qu'il code pour la pro-urotensine II humaine, le précurseur de l'urotensine II humaine et correspond au segment 93-407

de la SEQ ID NO:4;

- un fragment de la séquence codant pour la prépro-urotensine II

humaine (séquence SEQ ID NO:6), caractérisé en ce qu'il code pour l'urotensine II humaine et correspond au segment 372-407 de la séquence SEQ ID NO:4 ;

30

- un fragment de la séquence codant pour la prépro-urotensine II

humaine, codant pour un dipeptide (Pro-Tyr), en amont du site de clivage tribasique, lui-même situé juste en amont de la séquence codant pour l'urotensine II humaine et spécifique de ladite séquence humaine (voir figure 2) ;

35

- des fragments, aptes à servir d'amorces constitués de 20 à 50 nucléotides de SEQ ID NO:4 et notamment les séquences SEQ ID NO:7-8 et 10-17 et

plus particulièrement les paires d'amorces suivantes :

. les séquences SEQ ID NO:7 et NO:8, correspondant respectivement aux segments 267-292 et 535-511 de la séquence SEQ ID NO:4 ;

- . les séquences SEQ ID NO:10 et 11 correspondant respectivement aux positions 198-216 et 381-404 de la séquence ID NO:4 ;
- . les séquences SEQ ID NO:12 et SEQ ID NO:13, correspondant respectivement aux positions 46-65 et 214-195 de la séquence SEQ ID NO:4 ;
- 5 . les séquences SEQ ID NO:14 (positions 9-28 de la séquence SEQ ID NO:4) et SEQ ID NO:13 ;
- . les séquences SEQ ID NO:15 (positions 14-33 de la séquence SEQ ID NO:4) et SEQ ID NO:13 ;
- 10 . les séquences SEQ ID NO:12 et SEQ ID NO:16 (positions 150-131 de la séquence SEQ ID NO:4) ;
- . les séquences SEQ ID NO:17 (positions 8-27 de la séquence SEQ ID NO:4) et SEQ ID NO:13.
 - des fragments, aptes à servir de sondes : séquence SEQ ID NO:4 et les fragments constitués de 20 à 50 nucléotides de la séquence SEQ ID NO:4. Lesdites 15 sondes sont de préférence utilisées dans les conditions d'hybridation suivantes :
 - . hybridation : 5X SSPE (0,9 M NaCl/0,05 M tampon sodium phosphate, pH 7,7/0,005 M EDTA), 0,1 % SDS, 10X Denhardt's (0,2 % Ficoll/0,2 % polyvinylpyrrolidone/0,2 % BSA), 50 µg/ml ARNt, 50 µg/ml ADN de sperme de saumon dénaturé. 37°C, une nuit.
- 20 . lavages : 5X SSPE/0,1 % SDS, 4 fois 5 minutes, température ambiante, 3X SSPE/0,1 % SDS, 2 fois 10 minutes, 30°C.
 - * séquences de rat :
 - la séquence codant pour la prépro-urotensine II de rat, de séquence SEQ ID NO:18, qui comprend 529 pb et dans laquelle :
 - 25 . le segment 1-36 est une séquence non-codante,
 - . le segment 37-405 code pour la prépro-urotensine II de rat, le segment 37-96 correspondant à la séquence codant pour le peptide signal et
 - . le segment 406-529 est non-codant (voir figure 3),
 - un fragment de la séquence codant pour la prépro-urotensine II de 30 rat (séquence SEQ ID NO:19), caractérisé en ce qu'il code pour la pro-urotensine II de rat, le précurseur de l'urotensine II de rat et correspond au segment 96-405 de la SEQ ID NO:18 ;
 - . un fragment de la séquence codant pour la prépro-urotensine II de rat (séquence SEQ ID NO:20), caractérisé en ce qu'il code pour l'urotensine II de rat 35 et correspond au segment 364-405 de la séquence SEQ ID NO:18 ;

- des fragments, aptes à servir d'amorces constitués de 20 à 50 nucléotides de SEQ ID NO:18 et notamment les séquences SED ID NO:36-42 et plus particulièrement les paires d'amorces suivantes :

5 . les séquences SEQ ID NO:36 et SEQ ID NO:37, correspondant respectivement aux positions 295-314 et 504-485 de la séquence SEQ ID NO:18 ;

. les séquences SEQ ID NO:38 (positions 280-299 de la séquence SEQ ID NO:18) et SEQ ID NO:37 ;

. les séquences SEQ ID NO:39 (positions 131-150 de la séquence SEQ ID NO:18) et SEQ ID NO:40 (positions 314-295 de la SEQ ID NO:18) ;

10 . les séquences SEQ ID NO:41 (positions 322-341 de la séquence SEQ ID NO:18) et SEQ ID NO:37 ;

. les séquences SEQ ID NO:42 (positions 50-69 de la SEQ ID NO:18) et SEQ ID NO:40.

- des fragments, aptes à servir de sondes : séquence SEQ ID NO:18 et les fragments constitués de 20 à 50 nucléotides de la séquence SEQ ID NO:18, notamment la SEQ ID NO:43 (positions 192-221 de la séquence SEQ ID NO:18).

* séquences de souris

. la séquence codant pour la prépro-urotensine II de souris, de séquence SEQ ID NO:27, qui comprend 539 pb et dans laquelle :

20 . le segment 1-36 est une séquence non-codante,

. le segment 37-405 code pour la prépro-urotensine II de souris, le segment 37-96 correspondant à la séquence codant pour le peptide signal et

. le segment 406-539 est non-codant (voir figure 4),

25 - un fragment de la séquence codant pour la prépro-urotensine II de souris (séquence SEQ ID NO:28), caractérisé en ce qu'il code pour la pro-urotensine II de souris, le précurseur de l'urotensine de souris et correspond au segment 97-405 de la SEQ ID NO:27 ;

30 - un fragment de la séquence codant pour la prépro-urotensine II de souris (séquence SEQ ID NO:29), caractérisé en ce qu'il code pour l'urotensine II de souris et correspond au segment 355-405 de la séquence SEQ ID NO:27 ;

- des fragments, aptes à servir d'amorces constitués de 20 à 50 nucléotides de SEQ ID NO:27 et notamment les séquences SEQ ID NO:21-26 et plus particulièrement les paires d'amorces suivantes :

35 . les séquences SEQ ID NO:21 et SEQ ID NO:22, correspondant respectivement aux positions 295-314 et 485-504 de la séquence SEQ ID NO:27 ;

. les séquences SEQ ID NO:23 (positions 280-299 de la séquence SEQ ID NO:27) et SEQ ID NO:22 ;

les séquences SEQ ID NO:24 (positions 131-150 de la séquence SEQ ID NO:27) et SEQ ID NO:22 ;

les séquences SEQ ID NO:25 (positions 295-314 de la séquence SEQ ID NO:27) et SEQ ID NO:22 ;

5 les séquences SEQ ID NO:24 et SEQ ID NO:26 (positions 322-341 de la séquence SEQ ID NO:27).

- des fragments, aptes à servir de sondes : séquence SEQ ID NO:27 et les fragments constitués de 20 à 50 nucléotides de la séquence SEQ ID NO:27 et notamment la séquence SEQ ID NO:44 (positions 204-233 de la séquence 10 SEQ ID NO:27).

Les conditions d'hybridation des sondes murines sont similaires à celles exposées ci-dessus, pour les séquences humaines.

Compte tenu des données à la disposition des Inventeurs, il n'était pas évident que les mammifères puissent exprimer une urotensine II et que cette 15 dernière exerceât effectivement d'autres effets que des effets cardiovasculaires.

Lesdits polypeptides peuvent être produits, soit en exprimant les séquences d'acides nucléiques telles que définies ci-dessus dans des cellules hôtes, soit par synthèse, et notamment par synthèse selon la technique de Merrifield.

20 Les séquences nucléiques ci-dessus définies ont comme première application de détecter soit la présence ou l'absence de l'ARNm codant pour une urotensine II de mammifère et notamment pour l'urotensine II humaine dans des échantillons biologiques (biopsies, par exemple), notamment chez des sujets présentant une pathologie neurodégénérative ou un traumatisme de la moelle épinière, soit de détecter 25 une mutation dans la séquence du gène ou de l'ARNm codant pour l'urotensine (comparaison avec les séquences d'acides nucléiques selon l'invention).

Les séquences nucléiques ci-dessus définies ont comme deuxième application, la production de vecteurs aptes à exprimer les précurseurs de l'urotensine II humaine, notamment dans le cadre d'une thérapie génique ciblée.

30 Dans le cadre de ces applications, les séquences nucléiques sont avantageusement, sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences humaines, SEQ ID NO:4 à SEQ ID NO:6, les séquences de rat, SEQ ID NO:18 à SEQ ID NO:20 et les séquences de souris, SEQ ID NO:27 à SEQ ID NO:29.

La présente invention a également pour objet une cellule transformée par au moins un fragment d'acide nucléique tel que défini ci-dessus.

35 La présente invention a également pour objet des compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un polypeptide tel que défini ci-dessus ou au moins une séquence d'acides nucléiques codant pour

tout ou partie desdits polypeptides, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Au sens de la présente invention, on entend par véhicule pharmaceutiquement acceptable, aussi bien les véhicules usuels que ceux utilisés dans 5 le cadre d'une thérapie génique.

De manière préférée, lesdites compositions sont administrées par voie intrathécale.

Les compositions selon la présente invention, permettent notamment de traiter les maladies neurodégénératives de la moelle épinière, en particulier les 10 maladies de la plaque neuromusculaire et plus particulièrement les maladies amyotrophiques, telles que la sclérose latérale amyotrophique ou les traumatismes de la moelle épinière, plus particulièrement les paraplégies et les hémiplégies.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, lesdites compositions sont caractérisées en ce que le polypeptide est choisi dans le groupe 15 constitué par la prépro-urotensine II humaine (SEQ ID NO:1), la pro-urotensine II humaine (SEQ ID NO:2) et l'urotensine II humaine (SEQ ID NO:3), la prépro-urotensine II de rat (SEQ ID NO:30), la pro-urotensine II de rat (SEQ ID NO:31) et l'urotensine II de rat (SEQ ID NO:32), la prépro-urotensine II de souris (SEQ ID NO:33), la pro-urotensine II de souris (SEQ ID NO:34) et l'urotensine II de souris (SEQ ID NO:35).

Dans un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, lesdites compositions sont caractérisées en ce que les séquences nucléiques sont sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences humaines, SEQ ID NO:4 à 25 SEQ ID NO:6, les séquences de rat, SEQ ID NO:18 à SEQ ID NO:20 et les séquences de souris, SEQ ID NO:27 à SEQ ID NO:29.

La présente invention a en outre pour objet, l'utilisation de polypeptides appartenant à la famille de l'urotensine II ou de séquences nucléiques codant pour lesdits polypeptides, pour la préparation d'un médicament destiné à traiter les maladies neurodégénératives de la moelle épinière ou les traumatismes de la 30 moelle épinière.

Les polypeptides appartenant à la famille de l'urotensine II aptes à être utilisés conformément à l'invention peuvent avoir pour origine, aussi bien les invertébrés que les vertébrés, notamment les mammifères, et de préférence les mammifères humains.

35 Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite utilisation est caractérisée en ce que le polypeptide est choisi dans le groupe constitué par la prépro-urotensine II humaine (SEQ ID NO:1), la pro-urotensine II humaine

(SEQ ID NO:2) et l'urotensine II humaine (SEQ ID NO:3), la prépro-urotensine II de rat (SEQ ID NO:30), la pro-urotensine II de rat (SEQ ID NO:31) et l'urotensine II de rat (SEQ ID NO:32), la prépro-urotensine II de souris (SEQ ID NO:33), la pro-urotensine II de souris (SEQ ID NO:34) et l'urotensine II de souris (SEQ ID NO:35).

5 Dans un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite utilisation est caractérisée en ce que les polynucléotides sont sélectionnés dans le groupe constitué par les séquences humaines, SEQ ID NO:4 à SEQ ID NO:6, les séquences de rat, SEQ ID NO:18 à SEQ ID NO:20 et les séquences de souris, SEQ ID NO:27 à SEQ ID NO:29.

10 La présente invention a, également, pour objet un kit de diagnostic, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence selon l'invention, apte à détecter la présence d'un ARNm, éventuellement modifié, codant pour une urotensine II de mammifère dans un échantillon biologique.

15 La présente invention a, en outre, pour objet l'utilisation desdits polypeptides, qui présentent également une activité hypertensive, pour la sélection d'antagonistes de cette activité (élection d'anti-hypertenseurs présentant une activité à l'encontre des urotensines II selon l'invention).

20 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

25 - la figure 1 illustre l'alignement des séquences en acides aminés déduites respectivement des prépro-UII humaine, de grenouille et de carpe. Dans cette figure, la séquence signal est indiquée en italique ; les acides aminés conservés sont indiqués en noir ; les sites de clivage de la prohormone sont indiqués par des étoiles et les résidus acides conservés sont indiqués par un cercle noir. Le pont disulfure présent dans la séquence de l'UII est indiqué sous la séquence de l'urotensine II. Les acides aminés sont numérotés sur la droite de la figure ;

30 - la figure 2 illustre la structure des prépro-UII, pro-UII et UII humaines ;

- la figure 3 illustre la structure des prépro-UII, pro-UII et UII de rat ;

- la figure 4 illustre la structure des prépro-UII, pro-UII et UII de souris ;

35 - la figure 5 illustre la distribution tissulaire de l'ARNm de la prépro-UII humaine. La figure 5A illustre l'analyse en *dot blot* de l'expression de l'ARNm de la prépro-UII dans différents tissus humains, en utilisant le Masterblot de

Clontech (ARN poly(A) de 50 tissus humains différents (80-448 ng/point, standardisé en utilisant le taux d'expression en ARN de 8 gènes domestiques). Les contrôles positifs consistent en ADN génomique humain ; les contrôles négatifs incluent de l'ADN ou de l'ARN de levure ou d'*E. coli* ainsi que des séquences génomiques répétées humaines (H). Le *blot* est hybride avec la sonde d'ADNc codant pour la prépro-UII humaine et exposé pendant 2 jours à un film X-Omat. La figure 5B illustre l'analyse en Northern Blot de l'expression de l'ARNm de prépro-UII dans la moelle épinière humaine ; 2 µg d'ARNm poly(A) de moelle épinière sont hybrides avec la sonde constituée par l'ADNc de la prépro-UII humaine. La taille est déterminée en utilisant 5 des marqueurs de taille des ARN (chaînes de nucléotides standards calibrés). La figure 10 5C correspond à des autoradiographies aux rayons X et montre la distribution de l'ARNm de la prépro-UII dans la moelle épinière humaine. Les sections frontales sont hybrideées avec une ribosonde prépro-UII anti-sens (1) ou sens (2) et exposées pendant 15 10 jours à des films sensibles aux rayons X ;

- la figure 6 est une comparaison des structures primaires de l'urotensine II de différentes espèces. Des tirets ont été introduits pour que les séquences présentent un alignement optimal. Les points illustrent les identités de résidus d'acides aminés entre les différentes séquences, par rapport à la séquence humaine.

20 - la figure 7 illustre la distribution tissulaire de l'ARNm de la prépro-UII de rat et de souris.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

25 EXEMPLE

- Matériel et Méthodes

* Isolement de l'ADNc de la prépro-UII humaine :

Une séquence EST (*expressed sequence tag*) codant pour un peptide ayant une certaine identité avec l'urotensine II de grenouille est enregistrée sous le 30 n° AA535545 (Genbank). Cette séquence dérive d'une analyse EST de clones d'ADNc obtenus à partir de tumeurs du colon.

Deux amorces (5'-AACCCAAGAGGAAATTGAGAAAGTT-3' (SEQ ID NO:7) et 5'-CCAGGTAACAATGAACAGGGTAG-3' (SEQ ID NO:8)) déduites de la séquence EST permettent de synthétiser un fragment de 269 pb par RT-35 PCR à partir d'un échantillon de tumeur du colon humain, dans les conditions suivantes :

94°C, 4 min, 1X ; 94°C, 1 min ; 55°C, 1 min ; 72°C, 1 min, 30X ;

72°C, 5 min, 1X.

Le produit de la PCR est marqué avec des [³²P] dCTP par amorçage aléatoire, puis hybride avec différents tissus humains contenant des ARN poly(A) ainsi qu'avec des contrôles positifs et négatifs (MasterBlot, Clontech, Palo Alto).

- 5 L'hybridation et les lavages sont réalisés dans les conditions suivantes :

* préhybridation : incubation à 42°C, au moins 5 heures dans un milieu réactionnel comprenant :

50 % formamide, 5X SSC, 5X Denhardt's, 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 200 µg/ml ADN de sperme de saumon, 0,1 % SDS.

- 10 * hybridation : même milieu que le milieu de préhybridation avec la sonde marquée en plus.

* lavages : 4 fois 5 minutes à température ambiante, 2X SSC + 0,1 % SDS, puis 2 fois 10 minutes à 42°C, 0,1 % SDS + 0,1 % SDS.

- 15 Le *blot* est exposé à un film X-OMAT (Kodak) et les signaux d'hybridation sont quantifiés à l'aide du logiciel Densylab (Bioprobe Systems, France).

Le signal d'hybridation le plus important est obtenu dans la moelle épinière.

- 20 Dans ces conditions, l'ARN poly(A) de moelle épinière humaine (Clontech) est utilisé pour l'amplification de l'extrémité 5' de l'ADNc d'U11 humaine avec un kit RACE (kit d'amplification Marathon cDNA, Clontech).

* Analyse en Northern blot (transfert d'ARN sur membrane) :

- 25 2 µg d'ARN poly(A) de moelle épinière humaine (Clontech) sont déposés sur gel d'agarose-formaldéhyde ; après migration, on procède à un transfert sur membrane de nylon et à une hybridation avec le produit de la PCR spécifique de l'ADNc de l'U11 humaine marqué par incorporation de [³²P] dCTP.

* Hybridation in situ :

- Des ribosondes sens et anti-sens humaines sont préparées par transcription *in vitro* des produits de la PCR obtenus avec des amorces prépro-U11 spécifiques 5'-CTGCCAGAGATGCTGGTG-3' (SEQ ID NO:10) et 5'-GACACAGTATTCCAGAAGCAATC-3' (SEQ ID NO:11) étendues à leur extrémité 5'-terminale avec les promoteurs SP6 et T7 des ARN polymérasées correspondantes ; la transcription est réalisée en présence de [³⁵S]UTP (Amersham) ou de digoxigénine-11-UTP (Boehringer), et de T3 ou T7 ARN polymérase, dans les mêmes conditions de PCR que celles exposées ci-dessus.

Une portion de moelle épinière cervicale humaine a été obtenue par autopsie d'un sujet de sexe masculin âgé de 70 ans.

Le fragment de tissu est fixé dans du formaldéhyde 4 % pendant 24 heures, inclus dans du Tissue-Tek et congelé dans de l'azote liquide.

Des sections frontales (12 µm d'épaisseur) sont coupées à l'aide d'un cryostat et conservées à -80°C.

5 Les sections sont prétraitées comme décrit dans H. Tostivint et al. (14) et recouvertes d'un tampon de préhybridation (50 % formamide, 0,6 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,02 % Ficoll, 0,02 % polyvinylpyrrolidine, 0,1 % BSA, 1 mM EDTA , pH 8,0 , 550 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé, 50 µg/ml d'ARNT de levure).

10 L'hybridation est réalisée à 55°C pendant une nuit dans le même tampon (à l'exception de la concentration en ADN de sperme de saumon dénaturé : 60 µg/ml), complémenté avec 10 mM de dithiothréitol, du sulfate de dextran à 10 % et des ribosondes dénaturées par la chaleur.

15 Les sondes marquées au ^{35}S et les sondes marquées à la digoxigénine sont diluées dans le tampon d'hybridation pour obtenir une concentration finale de 5.10^6 dpm/ml et 1:100 (v/v), respectivement.

Les coupes sont lavées dans du tampon 2X SSC à 60°C et traitées avec de la RNase A (50 µg/ml) pendant 60 min à 37°C.

20 Cinq lavages dans des conditions stringentes sont effectués dans un tampon 0,1X SSC, 14 mM de β -mercaptopéthanol, 0,05 % de pyrophosphate de sodium à 60°C.

25 Les sections hybridées avec les ribosondes marquées au ^{35}S sont déshydratées dans des solutions d'éthanol comprenant des concentrations croissantes d'acétate de sodium 0,3 M et exposées sur un film Hyperfilm- β max (Amersham) pendant 2 semaines.

30 Les sections hybridées avec les ribosondes marquées à la digoxigénine sont lavées dans un tampon 1 (100 mM Tris-HCl et 150 mM NaCl, pH 7,5), incubées pendant 30 min dans un tampon de blocage (2 % d'agent bloquant Boehringer dans du tampon 1) et incubées pendant 2 heures dans le tampon 1 contenant 1:500 d'anticorps anti-digoxigénine conjugués à la phosphatase alcaline (Boehringer), 1 % de sérum de mouton normal et 0,1 % de Triton X100. Les sections sont rincées deux fois pendant 10 min dans le tampon 1 et 10 min dans le tampon 2 (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl et 50 mM MgCl₂, pH 9,5), puis incubées pendant 3 heures dans une solution chromagène consistant en Fast Red TR/Naphtol AS-MX et 3 mM Levamisole (Sigma).

35 La réaction est arrêtée par rinçage dans un tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).

Les sections sont examinées avec un microscope (Leitz Orthoplan).

* Séquençage

Le produit de l'amplification est sous-cloné dans un vecteur pGEM-T (Promega) et séquencé avec les amores SP6 et T7 en utilisant le kit de séquençage 5 Amersham (Thermo Sequenase).

- Résultats

* Caractérisation de l'ADNc de prépro-UII humaine :

Le cadre de lecture ouvert des ADNc du précurseur de l'UII humaine code pour une protéine de 124 acides aminés (figure 1 et figure 2).

10 L'organisation des précurseurs UII humains est similaire à celle de la prohormone UII de carpe et à celle du précurseur UII de la grenouille. Tous ces précurseurs comprennent une séquence signal en N-terminal puis un peptide flanquant, un site de clivage protéolytique (Lys/Arg-Lys-Arg) et la séquence de l'urotensine II, localisée à l'extrémité C-terminale de chaque précurseur.

15 Les peptides flanquants N-terminaux des précurseurs de carpe, de grenouille et humain ne présentent quasiment pas de similarité.

L'UII humaine ne comprend que 11 acides aminés alors que l'UII de grenouille et de carpe en possèdent respectivement 13 et 12 (figure 6).

20 La séquence de l'heptapeptide cyclique C-terminal de l'urotensine II est conservée chez la grenouille et chez l'homme. Au contraire, la région N-terminale du peptide est très variable.

Chez la grenouille, comme chez la carpe, la région C-terminale du peptide flanquant contient un site de clivage potentiel dibasique (Arg-Lys et Arg-Arg) qui pourrait générer le dipeptide conservé Gln-Phe.

25 Cependant, chez l'homme, la séquence du dipeptide correspondant est totalement différente (Pro-Tyr) (figure 1 et figure 2).

* Distribution de l'ARNm de la prépro-UII humaine a été étudiée :

La distribution tissulaire de l'ARNm de la prépro-UII humain a été étudiée par analyse dot blot (figure 5A).

30 Sur les 50 tissus différents testés, la moelle épinière présente le signal d'hybridation le plus important. L'ARNm de la prépro-UII est également observé dans la *medulla oblongata* mais l'intensité du signal est bien plus faible que celle obtenue dans la moelle épinière.

35 Dans les tissus périphériques, la présence d'ARNm de la prépro-UII est détectée dans le rein, la rate, l'intestin grêle, le thymus, la prostate, l'hypophyse, la glande surrénale et en moindres quantités, dans l'estomac, le pancréas, les ovaires et le foie (figure 5A).

L'analyse par *Northern blot* révèle la présence d'une seule bande correspondant à un ARNm de la prépro-UII d'environ 700 pb, dans la moelle épinière humaine.

Le marquage de sections de la portion cervicale de la moelle épinière humaine par hybridation *in situ* montre que l'ARNm de la prépro-UII est localisé dans les motoneurones (figure 5C).

* Caractérisation de l'ADNc de prépro-UII de rat et de souris :

Le cadre de lecture ouvert des ADNc du précurseur de l'UII de rat et de souris code pour une protéine de 123 acides aminés (figures 3 et 4).

La figure 7 illustre les résultats de la distribution dans divers tissus de rat et de souris par RT-PCR. Les ARN totaux sont extraits et soumis à une réaction de RT-PCR, dans des conditions similaires à celles exposées ci-dessus.

A la figure 7A, les produits PCR de rat (gauche) et de souris (droite) sont détectés par hybridation avec une sonde oligonucléotidique interne et spécifique de rat et de souris (respectivement les séquences SEQ ID NO:43 et 44).

La figure 7B illustre le dépôt sur gel d'agarose des produits PCR GAPDH utilisés comme contrôle pour refléter des taux équivalents d'ARN.

RÉFÉRENCES

1. H.A. Bern et al., *Rec. Prog. Horm. Res.*, 1985, **41**, 533-552.
2. D. Pearson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, **77**, 5021-5024.
3. J.M. Conlon et al., *Regul. Pept.*, 1997, **69**, 95-103.
4. D. Waugh et J.M. Conlon, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1993, **92**, 419-427.
5. D. Waugh et al., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1995, **99**, 323-332.
6. J.M. Conlon et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, **188**, 578-583.
7. G.C. Gonzalez et al., *Peptides*, 1992, **13**, 695-703.
8. H. Itoh et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 1988, **149**, 61-66.
9. A. Gibson et al., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1986, **64**, 435-439.
10. I. Muramatsu et al., *Gunma Symp. Endocrinol.*, 1979, **16**, 39-47.
11. K. Yano et al., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1994, **96**, 412-419.
12. K. Yano et al., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1996, **97**, 103-110.
13. S. Ohsako et al., *J. Neurosci.*, 1986, **6**, 2730-2735.
14. H. Tostivint et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**, 12605-12610.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écartier du cadre ni de la portée de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Polypeptides, isolés de mammifères, caractérisés en ce qu'ils comprennent à leur extrémité C-terminale un heptapeptide présentant la séquence suivante : Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Xaa dans laquelle Xaa représente Val ou Ile, en ce qu'ils appartiennent à la famille des urotensines II et en ce qu'ils présentent au moins 45 %, et de préférence au moins 70 % de similarité avec le polypeptide de séquence SEQ ID NO:1, correspondant à la prépro-urotensine II humaine.

10 2°) Polypeptides de mammifères selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés dans le groupe constitués par les séquences humaines SEQ ID NO:1-3, par les séquences de rat SEQ ID:30-32 et par les séquences de souris SEQ ID NO:33-35.

15 3°) Fragments d'acides nucléiques purifiés, caractérisés en ce qu'ils comprennent tout ou partie d'une séquence codant pour un polypeptide selon la revendication 1 ou la revendication 2 ou sa séquence complémentaire, sens ou antisens, à l'exception de l'EST ayant pour numéro d'accession Gen Bank, le n° AA535545.

20 4°) Fragments d'acides nucléiques selon la revendication 3, caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:4-6, les séquences SEQ ID NO:18-20 et les séquences SEQ ID NO:27-29.

25 5°) Vecteurs recombinants caractérisés en ce qu'ils contiennent un fragment d'acide nucléique selon la revendication 3 ou la revendication 4.

6°) Cellules transformées par au moins un fragment d'acide nucléique selon la revendication 3 ou la revendication 4.

30 7°) Réactif de détection d'un fragment d'acide nucléique selon la revendication 3 ou la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comprend entre 20 et 50 nucléotides de la séquence SEQ ID NO:4, de la séquence SEQ ID NO:18 ou de la séquence SEQ ID NO:27.

8°) Réactif selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par :

- un fragment de la séquence codant pour la prépro-urotensine II humaine, codant pour un dipeptide (Pro-Tyr), en amont du site de clivage tribasique, 35 lui-même situé juste en amont de la séquence codant pour l'urotensine II humaine et spécifique de ladite séquence humaine ;

- des fragments, aptes à servir d'amorces : SEQ ID NO:7 et NO:8, SEQ ID NO:10-17 ; SEQ ID NO:21-26 ; SEQ ID NO:36-42, et

5 - des fragments, aptes à servir de sondes : séquence SEQ ID NO:4 et les fragments constitués de 20 à 50 nucléotides de ladite séquence SEQ ID NO:4 ; séquence SEQ ID NO:18 et les fragments constitués de 20 à 50 nucléotides de ladite séquence SEQ ID NO:18 et séquence SEQ ID NO:27 et les fragments constitués de 20 à 50 nucléotides de ladite séquence SEQ ID NO:27.

10 9°) Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2 ou une séquence d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 3 et 4 codant pour tout ou partie desdits polypeptides, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

15 10°) Utilisation de polypeptides appartenant à la famille de l'urotensine II ou de séquences nucléiques codant pour lesdits polypeptides, pour la préparation d'un médicament destiné à traiter les maladies neurodégénératives de la moelle épinière ou les traumatismes de la moelle épinière.

20 11°) Procédé de détection de la présence ou de l'absence d'un ARNm codant pour une urotensine II de mammifère, notamment chez des sujets présentant une pathologie neurodégénérative ou un traumatisme de la moelle épinière par mise en contact d'un échantillon biologique, convenablement traité, avec au moins un réactif selon la revendication 7 ou la revendication 8.

25 12°) Procédé de détection d'une mutation dans la séquence du gène ou de l'ARNm codant pour l'urotensine, caractérisé en ce qu'il comprend l'extraction dudit ADN ou dudit ARNm à partir d'un échantillon biologique et sa comparaison avec les séquences d'acides nucléiques selon la revendication 3 ou la revendication 4.

30 13°) Kit de diagnostic, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4, apte à détecter la présence d'un ARNm, éventuellement modifié, codant pour une urotensine II de mammifère dans un échantillon biologique.

14°) Utilisation des polypeptides selon la revendication 1 ou la revendication 2, pour la sélection d'anti-hypertenseurs.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Humain	- M Y K L A S C C L L F / G F L N P L L S L P L D S R E I S F Q L S A P H E D A R L T P E E L E R	49
Grenouille	- M S K L F C C L I L A G S F C S F R S L P I V P S K G B L R L S E S A L D F G D L K S W D D E	49
Carpe a	M M C N L L S F S C T H E V A H P V T D T A D M T Y S G P D S V E E A G G V S - P D D F	49
Carpe y	M M C N L L S C S V L L S C S H L L A H P V T D T A D M T Y S G P D S V E E A G G V N - P D D F	49
Humain	A S L L Q I L P E M L G - - A E R G - - D I L R K A D S S T N I F N P R G N L R K F Q D P	96
Grenouille	T R L L R N L P M F V D K E A E D I F S K E G F G L D A Y N - M D D K E E L F D K H P R - -	96
Carpe a	A V S D L N D L L Q R A A V V E Y S - - P L L S R E N I K V P G Q I P K E A L R E E L L E K P Y - -	96
Carpe y	S V S D L N E H L Q R A A V A G Y S - - P L F S Q E N I K V P G Q I P K E A L R E E L L E K P Y - -	96
	* * * → → UROTTENSINE II	
Humain	N I L L S H L L A R I W K P Y K K R E T - - P D C F W K Y C V	124
Grenouille	I S L L S R L Q S K D R K Q F K K R A G N L S E C F W K Y C V	127
Carpe a	R L I P P S G L W G S R R Q F R K R G G - G A D C F W K Y C V	126
Carpe y	R L I P P R G L W G S R R Q F R K R G G - G A D C F W K Y C V	125

FIGURE 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/8

CCAAGAAGGAAGCCGTCTATCTTGTGGCGATC

ATG TAT AAG CTG GCC TCC TGC TGT TTG CTT TTC ATA GGA TTC TTA
 Met Tyr Lys Leu Ala Ser Cys Cys Leu Leu Phe Ile Gly Phe Leu

PEPTIDE SIGNAL

AAT CCT CTC TTA TCT CTT CCT CTC CTT GAC TCC AGG GAA ATA TCC
 Asn Pro Leu Leu Ser Leu Pro Leu Leu Asp Ser Arg Glu Ile Ser

TTT CAA CTC TCA GCA CCT CAT GAA GAC GCG CGC TTA ACT CCG GAG
 Phe Gln Leu Ser Ala Pro His Glu Asp Ala Arg Leu Thr Pro Glu

PRO-SEGMENT

GAG CTA GAA AGA GCT TCC CTT CTA CAG ATA CTG CCA GAG ATG CTG
 Glu Leu Glu Arg Ala Ser Leu Leu Gln Ile Leu Pro Glu Met Leu

GGT GCA GAA AGA GGG GAT ATT CTC AGG AAA GCA GAC TCA AGT ACC
 Gly Ala Glu Arg Gly Asp Ile Leu Arg Lys Ala Asp Ser Ser Thr

AAC ATT TTT AAC CCA AGA GGA AAT TTG AGA AAG TTT CAG GAT TTC
 Asn Ile Phe Asn Pro Arg Gly Asn Leu Arg Lys Phe Gln Asp Phe

TCT GGA CAA GAT CCT AAC ATT TTA CTG AGT CAT CTT TTG GCC AGA
 Ser Gly Gln Asp Pro Asn Ile Leu Leu Ser His Leu Leu Ala Arg

ATC TGG AAA CCA TAC AAG AAA CGT GAG ACT CCT GAT TGC TTC TGG
 Ile Trp Lys Pro Tyr Lys Lys Arg Glu Thr Pro Asp Cys Phe Trp

UROTENSINE II

AAA TAC TGT GTC TGA
 Lys Tyr Cys Val ***

AGTGAAATAAGCATCTGTTAGTCAGCTCAGAACACCCATCTTAGAATATGAAAAATAACACA
 ATGCTTGATTGAAAACAGTGTGGAGAAAAACTAGGCAAACATACACCCTGTTATTGTTACCT
 GGAAAATAATCCTCTAT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/8

9 18 27 36 45 54
 5' CGG AGC AGA CAC CCA GCC AGA CTT CTT CCC GTC GTC ATG GAC AGG GTG CCC TTC
 Met Asp Arg Val Pro Phe
 ↓.....

63 72 81 90 99 108
 TGC TGC CTG CTC TTC GTA GGA CTC CTG AAT CCA CTC CTG TCT TTT CCC GTC ACG
 Cys Cys Leu Leu Phe Val Gly Leu Leu Asn Pro Leu Leu Ser Phe Pro Val Thr
→

peptide signal

117 126 135 144 153 162
 GAC ACT GGT GAA ATG TCT CTT CAG CTT CCA GTG CTT GAG GAA AAT GCT CTT CGG
 Asp Thr Gly Glu Met Ser Ieu Gln Leu Pro Val Leu Glu Glu Asn Ala Leu Arg
→

171 180 189 198 207 216
 GCT CTG GAG GAG CTG GAG AGG ACT GCC CTC CTG CAG ACG CTG CGC CAG ACC GTG
 Ala Leu Glu Glu Leu Glu Arg Thr Ala Leu Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Val
→

pro-segment

225 234 243 252 261 270
 GGC ACA GAA GCA GAG GGA AGC CTT GGC CAG GCA GAT CCC AGT GCC GAG ACT CCC
 Gly Thr Glu Ala Glu Gly Ser Leu Gly Gln Ala Asp Pro Ser Ala Glu Thr Pro
→

279 288 297 306 315 324
 ACT CCA AGG GGA AGC TTG AGG AAG GCT CTC ACT CGG CAA GAT TCT AAC ACT GTA
 Thr Pro Arg Gly Ser Leu Arg Lys Ala Leu Thr Gly Gln Asp Ser Asn Thr Val
→

333 342 351 360 369 378
 CTG AGC CGT CTT TTG GCG AGA ACC AGG AAA CAA CGT AAG CAA CAC GGG ACT GCC
 Leu Ser Arg Leu Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln Arg Lys Gln His Gly Thr Ala
→

387 396 405 414 423 432
CCA GAA TGC TTC TGG AAG TAC TGC ATT TCA AGA GAG ACG TCT CCT CAG AAC CAT
Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Jle ***

UrotensineII

441 450 459 468 477 486
 CAC TTC AGG AAA CTA AAG AGC ACA TGC TTG AAG AAA AAT CGT GCC AAC AAC GCC

495 504 513 522
 CCG TTC TCC ACT ATG AGA AAT AAA CCC TCT ATG TTT CTC AAC T 3'

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/8

9 18 27 36 45 54
 5' CCA GAG CAG ACG CCC AGA CGG ACT TCT CGC CGC ATC ATG GAC AGG GTG CCC TTC
 Met Asp Arg Val Pro Phe

63 72 81 90 99 108
 TGC TGC CTG CTC TTC ATA GGA CTT CTG AAT CCA CTG CTG TCC CTT CCC GTC ACG
 Cys Cys Leu Leu Phe Ile Gly Leu Leu Asn Pro Leu Leu Ser Leu Pro Val Thr

peptide signal

117 126 135 144 153 162
 GAC ACT GGT GAG AGG ACT CTT CAG CTT CCA GTG CTT GAG GAA GAC GCT CTT CGG
 Asp Thr Gly Glu Arg Thr Leu Gln Leu Pro Val Leu Glu Glu Asp Ala Leu Arg

171 180 189 198 207 216
 GCT CTG GAG GAG CTG GAG AGG ATG GCC CTC CTG CAG ACC CTG CGT CAG ACC ATG
 Ala Leu Glu Glu Leu Glu Arg Met Ala Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Met

pro-segment

225 234 243 252 261 270
 GGC ACG GAA GCA GGG GAG AGC CCT GGA GAA GCA GGT CCC AGC ACT GAG ACT CCC
 Gly Thr Glu Ala Gly Glu Ser Pro Gly Glu Ala Gly Pro Ser Thr Glu Thr Pro

279 288 297 306 315 324
 ACT CCA CGG GGA AGC ATG AGG AAG GCT TTC GCT GGG CAA AAT TCT AAC ACT GTA
 Thr Pro Arg Gly Ser Met Arg Lys Ala Phe Ala Gly Gln Asn Ser Asn Thr Val

333 342 351 360 369 378
 CTG AGT CGT CTC TTG GCA AGA ACC AGG AAA CAA CAT AAG CAA CAC GGG GCT GCC
 Leu Ser Arg Leu Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln His Lys Gln His Gly Ala Ala

387 396 405 414 423 432
 CCA GAG TGC TTC TGG AAA TAC TGC ATT TGA GGA GAC ACA AGC GCC CGT TGG TCT
 Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile ***

Urotensine II

441 450 459 468 477 486
 CTC AGA ACC ATT ACA TTC AGG AAA CGG GCA GAG CAG ATG CTT GAA GCA AAA TCA

495 504 513 522 531
 CGC TAA CGA CGC CTT GTT CTT CAT TAT GAG AAA TAA ATC CTC TAT GTT TCT CA 3'

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5 / 8

A

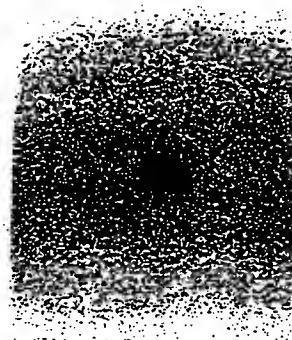
1 2 3 4 5 6 7 8

A**B****C****D****E****F****G****H**

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	cerveau entier	amygdale	noyau caudé	cervelet	cortex cérébral	lobe frontal	hippocampe	<i>medulla oblongata</i>
B	lobe occipital	putamen	<i>locus niger</i>	lobe temporal	thalamus	noyau sous-thalamique	moelle épinière	-
C	cœur	aorte	muscle squelettique	colon	vessie	utérus	prostate	estomac
D	testicules	ovaires	pancréas	hypophyse	glande surrénale	thyroïde	glande salivaire	glande mammaire
E	rein	foie	intestin grêle	rate	thymus	leucocyte périphérique	ganglion lymphatique	moelle osseuse
F	appendice	poumon	trachée	placenta	-	-	-	-
G	cerveau foetal	cœur foetal	rein foetal	foie foetal	rate foetale	thymus foetal	poumon foetal	-
H	ARN total de levure 100 ng	ARNt de levure 100 ng	ARNr d' <i>E. coli</i> 100 ng	ADN d' <i>E. coli</i> 100 ng	poly r(A)	ADN C _{0.1} humain 100 ng	ADN humain 100 ng	ADN humain 500 ng

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6 / 8

B**725 pb →**moelle
épinière**C**

(1)



(2)

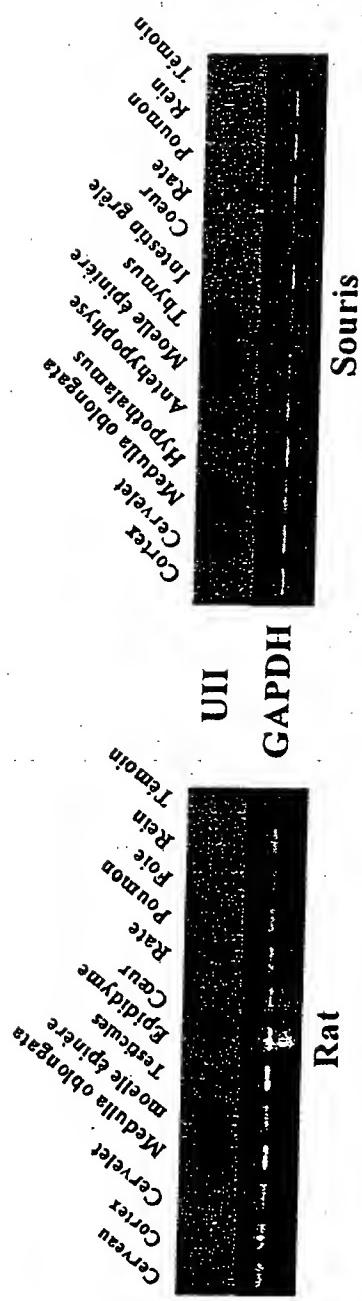
FIGURE 5.2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIGURE 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8 / 8

FIGURE 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE MEDICALE
BEAUVILLAIN, Jean-Claude
COLOUARN, Yolaine
JEGOU, Sylvie
LIHRMANN, Isabelle
VAUDRY, Hubert

<120> UROTENSINES II DE MAMMIFERES ET LEURS APPLICATIONS

<130> s598PCT25

<140>

<141>

<150> FR9814914

<151> 1998-11-26

<160> 44

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Tyr Lys Leu Ala Ser Cys Cys Leu Leu Phe Ile Gly Phe Leu Asn
1 5 10 15

Pro Leu Leu Ser Leu Pro Leu Leu Asp Ser Arg Glu Ile Ser Phe Gln
20 25 30

Leu Ser Ala Pro His Glu Asp Ala Arg Leu Thr Pro Glu Glu Leu Glu
35 40 45

Arg Ala Ser Leu Leu Gln Ile Leu Pro Glu Met Leu Gly Ala Glu Arg
50 55 60

Gly Asp Ile Leu Arg Lys Ala Asp Ser Ser Thr Asn Ile Phe Asn Pro
65 70 75 80

Arg Gly Asn Leu Arg Lys Phe Gln Asp Phe Ser Gly Gln Asp Pro Asn
85 90 95

Ile Leu Leu Ser His Leu Leu Ala Arg Ile Trp Lys Pro Tyr Lys Lys
100 105 110

Arg Glu Thr Pro Asp Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val
115 120

<210> 2
<211> 104
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Leu Pro Leu Leu Asp Ser Arg Glu Ile Ser Phe Gln Leu Ser Ala Pro
 1 5 10 15

His Glu Asp Ala Arg Leu Thr Pro Glu Glu Leu Glu Arg Ala Ser Leu
 20 25 30

Leu Gln Ile Leu Pro Glu Met Leu Gly Ala Glu Arg Gly Asp Ile Leu
 35 40 45

Arg Lys Ala Asp Ser Ser Thr Asn Ile Phe Asn Pro Arg Gly Asn Leu
 50 55 60

Arg Lys Phe Gln Asp Phe Ser Gly Gln Asp Pro Asn Ile Leu Leu Ser
 65 70 75 80

His Leu Leu Ala Arg Ile Trp Lys Pro Tyr Lys Lys Arg Glu Thr Pro
 85 90 95

Asp Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val
 100

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Thr Pro Asp Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val
 1 5 10

<210> 4

<211> 551

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

ccaaagaagga agccgtctat cttgtggcga tcatgtataa gctggcctcc tgctgttgc 60
 ttttcataagg attcttaaat cctctttat ctcttcctct ccttgactcc agggaaatat 120
 ccttcaact ctcagcacct catgaagacg cgcgcttaac tccggaggac gtagaaaagag 180
 cttcccttct acagatactg ccagagatgc tgggtgcaga aagaggggat attctcagga 240
 aagcagactc aagtaccaac atttttaacc caataggaaa tttgagaaaag tttcaggatt 300
 tctctggaca agatcctaac attttactga gtcatcttt ggccagaatc tggaaaaccat 360
 acaagaaaacg tgagactcct gattgcttct ggaaatactg tgtctgaagt gaaataagca 420
 tctgttagtc agctcagaaa caccatctt agaatatgaa aaataaacaca atgcttgatt 480
 taaaaacagt gtggagaaaa actaggcaa ctacaccctg ttcattgtta cctggaaaat 540
 aaatcctcta t 551

<210> 5

<211> 315

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 5

cttcctctcc ttgactccag ggaaatatcc tttcaactct cagcacctca tgaagacgcg 60
 cgcttaactc cggaggagct agaaaagagct tcccttctac agatactgcc agagatgctg 120
 ggtgcagaaa gaggggatat tctcaggaaa gcagactcaa gtaccaacat ttttaaccca 180

THIS PAGE BLANK (USPTO)

agaggaaatt tgagaaaatt tcaggatttc tctggacaag atcctaacat ttactgagt 240
catctttgg ccagaatctg gaaaccatac aagaaacgtg agactcctga ttgcttctgg 300
aaatactgtg tctga 315

<210> 6
<211> 36
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 6
gagactcctg attgcttctg gaaatactgt gtctga 36

<210> 7
<211> 26
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 7
aacccaagag gaaatttgag aaagtt 26

<210> 8
<211> 25
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 8
ccaggttaaca atgaacaggg tgtag 25

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val
1 5

<210> 10
<211> 19
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 10
ctgccagaga tgctgggtg 19

<210> 11
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 11
gacacagtat ttccagaagc aatc 24

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 12
cctcctgctg tttgcttttc

20

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 13
cccagcatct ctggcagtat

20

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 14
gaagccgtct atcttgcggc

20

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 15
cgtcttatctt gtggcgatca

20

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 16
cgtcttcatg aggtgctgag

20

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 17
ggaagccgtc tatcttgagg

20

<210> 18
<211> 529
<212> ADN
<213> Rattus sp.

<400> 18
cgagcagac acccagccag acttcttccc gtcgtcatgg acagggtgcc cttctgctgc 60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ctgctttcg taggactcct gaatccactc ctgtcttttc cggcacgga cactggtaa 120
 atgttcttc agttccagt gcttgaggaa aatgttcttc gggctctgga ggagctggag 180
 aggactgccc tcctgcagac gctgcgccag accgtggca cagaagcaga gggagccctt 240
 ggccaggcag atcccagtgc cgagactccc actccaaggg gaagctttag gaaggtctc 300
 actggcaag attctaacac tgtactgagc cgtctttgg cgagaaccag gaaacaacgt 360
 aagcaacacg ggactgcacc agaatgttcc tggaaagtact gcatttgaag agagacgtct 420
 cctcagaacc atcacttcag gaaactaaag agcagatgct tgaagaaaaa tcgtgccaac 480
 aacgccccgt tctccactat gagaataaaa ccctctatgt ttctcaact 529

<210> 19
 <211> 312
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.

<400> 19
 tttcccgta cggacactgg taaaatgtct cttcagcttc cagtgcttga gaaaaatgct 60
 cttcgggctc tggaggagct ggagaggact gccctcctgc agacgctgct ccagaccgtg 120
 ggcacagaag cagagggaaag cttggccag gcagatccca gtgcccagac tcccaactcca 180
 aggggaagct tgaggaaggc tctcaactgg caagattcta acactgtact gagccgtctt 240
 ttggcgagaa ccagggaaaca acgtaaagcaa cacggactg ccccaagatg cttcttggaaag 300
 tactgcattt ga 312

<210> 20
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.

<400> 20
 caacacggga ctgccccaga atgcttctgg aagtactgca tt 42

<210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus

<400> 21
 agttccagt gcttgaggaa 20

<210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus

<400> 22
 gttagaattt tgcccaagcga 20

<210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus

<400> 23
 gcttccagtg ctggaggaag 20

<210> 24

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 20
<212> ADN
<213> Mus

<400> 24
tctgctgcct gctttcata

20

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Mus

<400> 25
acggacactg gtgagaggac

20

<210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> Mus

<400> 26
gagcgtttc ctcaaggact

20

<210> 27
<211> 539
<212> ADN
<213> Mus

<400> 27
cgagagcaga cggccagacg gacttctcg cgcacatcatgg acagggtgcc cttctgtgc 60
ctgctttca taggacttct gaatccactg ctgtcccttc ccgtcacgga cactggtag 120
aggactcttc agttccagt gcttgaggaa gacgctttc ggctctggaa ggagctggag 180
aggatggccc tcctgcagac cctgcgtcag accatggca cggaaagcagg ggagagccct 240
ggagaagcag gtcccagcac tgagactccc actccacggg gaagcatgag gaaggctttc 300
gctgggcaaa attctaacac tgtactgagt cgtcttttgg caagaaccag gaaacaacat 360
aagcaacacg gggctgcccc agagtcttc tggaaatact gcatttgagg agacacaacg 420
gcccgttggc ctctcagaac cattacattc aggaaacggg cagagcagat gcttgaagca 480
aaatcacgct aacgacgcct tttttttcat tatgagaaat aaatcctcta tgttctca 539

<210> 28
<211> 443
<212> ADN
<213> Mus

<400> 28
cttccgtca cggacactgg tgagaggact cttcagcttc cagtgttga ggaagacgct 60
cttcggctc tggaggagct ggagaggatg gcccctctgc agaccctgcg tcagaccatg 120
ggcacggaag caggggagag ccctggagaa gcaggtccca gcaactgagac tcccactcca 180
cggggaaagca tgaggaaggc tttcgctggg caaaattcta acactgtact gagtcgtctc 240
ttggcaagaa ccaggaaaca acataagcaa cacgggctg ccccagagtg cttctggaaa 300
tactgcattt gaggagacac aagcgcggcgt tggtctctca gaaccattac attcaggaaa 360
cgggcagagc agatgcttga agaaaaatca cgctaacgac gccttggct tcattatgag 420
aaataaaatcc tctatgttcc tca 443

<210> 29
<211> 309

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<212> ADN
<213> Mus

<400> 29

cttcccgta cggacactgg tgagaggact cttagcttc cagtgcgtga ggaagacgct 60
cttcgggctc tggaggagct ggagaggatg gccctccctgc agaccctgcg tcagaccatg 120
ggcacggaag cagggggagag ccctggagaa gcaggtccca gcactgagac tcccactcca 180
cggggaagca tgaggaaggc ttgcgtggg caaaaattcta acactgtact gagtcgtctc 240
ttggcaagaa ccaggaaca acataagcaa cacggggctg cccagagtg cttctggaaa 300
tactgcatt 309

<210> 30

<211> 123

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 30

Met Asp Arg Val Pro Phe Cys Cys Leu Leu Phe Val Gly Leu Leu Asn
1 5 10 15

Pro Leu Leu Ser Phe Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Met Ser Leu Gln
20 25 30

Leu Pro Val Leu Glu Glu Asn Ala Leu Arg Ala Leu Glu Glu Leu Glu
35 40 45

Arg Thr Ala Leu Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Val Gly Thr Glu Ala
50 55 60

Glu Gly Ser Leu Gly Gln Ala Asp Pro Ser Ala Glu Thr Pro Thr Pro
65 70 75 80

Arg Gly Ser Leu Arg Lys Ala Leu Thr Gly Gln Asp Ser Asn Thr Val
85 90 95

Leu Ser Arg Leu Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln Arg Lys Gln His Gly
100 105 110

Thr Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
115 120

<210> 31

<211> 103

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 31

Phe Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Met Ser Leu Gln Leu Pro Val Leu
1 5 10 15

Glu Glu Asn Ala Leu Arg Ala Leu Glu Glu Leu Glu Arg Thr Ala Leu
20 25 30

Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Val Gly Thr Glu Ala Glu Gly Ser Leu
35 40 45

Gly Gln Ala Asp Pro Ser Ala Glu Thr Pro Thr Pro Arg Gly Ser Leu
50 55 60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Arg Lys Ala Leu Thr Gly Gln Asp Ser Asn Thr Val Leu Ser Arg Leu
65 70 75 80

Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln Arg Lys Gln His Gly Thr Ala Pro Glu
85 90 95

Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
100

<210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 32

Gln His Gly Thr Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
1 5 10

<210> 33

<211> 123

<212> PRT

<213> Mus

<400> 33

Met Asp Arg Val Pro Phe Cys Cys Leu Leu Phe Ile Gly Leu Leu Asn
1 5 10 15

Pro Leu Leu Ser Leu Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Arg Thr Leu Gln
20 25 30

Leu Pro Val Leu Glu Glu Asp Ala Leu Arg Ala Leu Glu Glu Leu Glu
35 40 45

Arg Met Ala Leu Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Met Gly Thr Glu Ala
50 55 60

Gly Glu Ser Pro Gly Glu Ala Gly Pro Ser Thr Glu Thr Pro Thr Pro
65 70 75 80

Arg Gly Ser Met Arg Lys Ala Phe Ala Gly Gln Asn Ser Asn Thr Val
85 90 95

Leu Ser Arg Leu Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln His Lys Gln His Gly
100 105 110

Ala Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
115 120

<210> 34

<211> 103

<212> PRT

<213> Mus

<400> 34

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Leu Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Arg Thr Leu Gln Leu Pro Val Leu
1 5 10 15

Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Met Gly Thr Glu Ala Gly Glu Ser Pro
35 40 45

Gly Glu Ala Gly Pro Ser Thr Glu Thr Pro Thr Pro Arg Gly Ser Met
50 55 60

Arg Lys Ala Phe Ala Gly Gln Asn Ser Asn Thr Val Leu Ser Arg Leu
 65 70 75 80

Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln His Lys Gln His Gly Ala Ala Pro Glu
85 90 95

Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
100

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus

<400> 35

Gln His Lys Gln His Gly Ala Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys
1 5 10 15

IIIe

<210> 36

<211> 20

<212> ADM

<213> Rattus sp.

<400> 36

gctctca

Page 10

<211> 20

<212> ADM

<213> Rat

2000 Results Sp.

tgtcatagt

Summary

<210> 38

<400> 38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ggaagcttga ggaaggctct

20

<210> 39
<211> 20
<212> ADN
<213> Rattus sp.

<400> 39
agttccagt gcttgaggaa

20

<210> 40
<211> 20
<212> ADN
<213> Rattus sp.

<400> 40
gaatcttgcc cagtgagagc

20

<210> 41
<211> 20
<212> ADN
<213> Rattus sp.

<400> 41
gtactgagcc gtctttggc

20

<210> 42
<211> 20
<212> ADN
<213> Rattus sp.

<400> 42
tgcctgctct tcgtaggact

20

<210> 43
<211> 30
<212> ADN
<213> Rattus sp.

<400> 43
gtgcccacgg tctggcgcaag cgtctgcagg

30

<210> 44
<211> 30
<212> ADN
<213> Mus

<400> 44
tccccctgctt ccgtgcccatt ggtctgacgc

30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02941

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12N15/16 C07K14/575 A61K38/22 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A61K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>CONLON J.M. ET AL.: "Somatostatin- and Urotensin II-related peptides: molecular diversity and evolutionary perspectives" REGULATORY PEPTIDES, vol. 69, no. 2, 26 March 1997 (1997-03-26), pages 95-103, XP002110991 cited in the application abstract page 100, left-hand column, paragraph 2 -page 101, left-hand column</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-9,11, 13,14

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

17 February 2000

25.02.00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, G

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Database EMBL ID AF172174 Accession number Z98884 28 August 1997 (28.08.97) 99% identity with Seq.ID:4 (nt.124841-125103, 126861-126903, 128032-128142, 130121-130254, brin complémentaire) XP002130764 the whole document ---	1-9,11, 13,14
A	Database EMBL ID HS1325142 Accession number AA535545 26 July 1997 (26.07.97) XP002111032 cited in the application the whole document ---	3,4
A	WO 97 49386 A (PEPTIDE DELIVERY SYSTEMS PTY LTD (AU) REDGRAVE TG; MARTINS IJ; COLE SK) 31 December 1997 (1997-12-31) page 12, line 17 -page 13, line 5; example 3 ---	9,14
A	PERKINS T.D.J. ET AL.: "Molecular modelling and design of analogues of the peptide hormone Urotensin II" BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 18, no. 5, October 1990 (1990-10), pages 918-919, XP002110993 the whole document ---	9,14
A	CONLON J.M. ET AL.: "Distribution and molecular forms of Urotensin II and its role in cardiovascular regulation in vertebrates" THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY, vol. 275, no. 2 3, 1 - 15 June 1996, pages 226-238, XP002110995 page 228; figure 2 page 233, right-hand column, paragraph 5 -page 235 ---	9,14
P,X	WO 99 35266 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP (US); SKB PLC (GB); SKB LAB PHARM (FR)) 15 July 1999 (1999-07-15) the whole document ---	1-14
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02941

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 00 00610 A (INCYTE PHARMA INC (US); LAL TANG GORGONE CORLEY GUEGLER BAUGHN ET AL) 6 January 2000 (2000-01-06) page 40, line 4 -page 44, line 3 page 10, line 20-30 Seq.ID:96,230 page 82 Seq.ID:96 page 101 page 155 -page 158; claims ---	1-7, 9-11,13, 14
P,X	COULOUARN Y. ET AL.: "Cloning of the cDNA encoding the Urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the Urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 95, no. 26, 22 December 1998 (1998-12-22), pages 15803-15808, XP002110994 page 15803, left-hand column, paragraph 1 page 15804; figure 1 page 15808; figure 6 ---	1-11,13
P,X	COULOUARN Y. ET AL.: "Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors." FEBS LETTERS, vol. 457, no. 1, 20 August 1999 (1999-08-20), pages 28-32, XP002130721 the whole document ---	1-11,13
A	MCMASTER D. ET AL.: "Characterization of the biologically and antigenically important regions of Urotensin II" PROCEEDINGS OF THE WESTERN PHARMACOLOGY SOCIETY, vol. 29, 1986, pages 205-208, XP002110992 ---	
A	ITOH H. ET AL.: "Functional receptors for fish neuropeptide Urotensin II in major rat arteries" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 149, 1988, pages 61-66, XP002110996 cited in the application -----	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9749386 A	31-12-1997	AU 2944197 A	14-01-1998
WO 9935266 A	15-07-1999	NONE	
WO 0000610 A	06-01-2000	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N°
PCT/FR 99/02941

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/16 C07K14/575 A61K38/22 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C07K A61K C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>CONLON J.M. ET AL.: "Somatostatin- and Urotensin II-related peptides: molecular diversity and evolutionary perspectives" REGULATORY PEPTIDES, vol. 69, no. 2, 26 mars 1997 (1997-03-26), pages 95-103, XP002110991 cité dans la demande abrégé page 100, colonne de gauche, alinéa 2 -page 101, colonne de gauche</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-9,11, 13,14

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

17 février 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25.02.00

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Macchia, G

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	Database EMBL ID AF172174 Numéro d'accésion Z98884 28 août 1997 99% identité avec Seq.ID:4 (nt.124841-125103, 126861-126903, 128032-128142, 130121-130254, brin complémentaire) XP002130764 le document en entier ---	1-9,11, 13,14
A	Database EMBL ID HS1325142 Numéro d'accésion AA535545 26 juillet 1997 XP002111032 cité dans la demande le document en entier ---	3,4
A	WO 97 49386 A (PEPTIDE DELIVERY SYSTEMS PTY LTD (AU) REDGRAVE TG; MARTINS IJ; COLE SK) 31 décembre 1997 (1997-12-31) page 12, ligne 17 -page 13, ligne 5; exemple 3 ---	9,14
A	PERKINS T.D.J. ET AL.: "Molecular modelling and design of analogues of the peptide hormone Urotensin II" BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 18, no. 5, octobre 1990 (1990-10), pages 918-919, XP002110993 le document en entier ---	9,14
A	CONLON J.M. ET AL.: "Distribution and molecular forms of Urotensin II and its role in cardiovascular regulation in vertebrates" THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY, vol. 275, no. 2 3, 1 - 15 juin 1996, pages 226-238, XP002110995 page 228; figure 2 page 233, colonne de droite, alinéa 5 -page 235 ---	9,14
P,X	WO 99 35266 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP (US); SKB PLC (GB); SKB LAB PHARM (FR)) 15 juillet 1999 (1999-07-15) le document en entier ---	1-14
		-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

de Internationale No
P.C./FR 99/02941

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
E	WO 00 00610 A (INCYTE PHARMA INC (US); LAL TANG GORGONE CORLEY GUEGLER BAUGHN ET AL) 6 janvier 2000 (2000-01-06) page 40, ligne 4 -page 44, ligne 3 page 10, ligne 20-30 Seq.ID:96,230 page 82 Seq.ID:96 page 101 page 155 -page 158; revendications ---	1-7, 9-11,13, 14
P,X	COULOUARN Y. ET AL.: "Cloning of the cDNA encoding the Urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the Urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 95, no. 26, 22 décembre 1998 (1998-12-22), pages 15803-15808, XP002110994 page 15803, colonne de gauche, alinéa 1 page 15804; figure 1 page 15808; figure 6 ---	1-11,13
P,X	COULOUARN Y. ET AL.: "Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors." FEBS LETTERS, vol. 457, no. 1, 20 août 1999 (1999-08-20), pages 28-32, XP002130721 le document en entier ---	1-11,13
A	MCMASTER D. ET AL.: "Characterization of the biologically and antigenically important regions of Urotensin II" PROCEEDINGS OF THE WESTERN PHARMACOLOGY SOCIETY, vol. 29, 1986, pages 205-208, XP002110992 ---	
A	ITOH H. ET AL.: "Functional receptors for fish neuropeptide Urotensin II in major rat arteries" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 149, 1988, pages 61-66, XP002110996 cité dans la demande -----	

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9749386 A	31-12-1997	AU 2944197 A	14-01-1998
WO 9935266 A	15-07-1999	AUCUN	
WO 0000610 A	06-01-2000	AUCUN	